



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>C12N 15/10, 15/62, 15/66, 15/70 // 9/22</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/28415</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>2. Juli 1998 (02.07.98)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE97/02963</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>18. Dezember 1997 (18.12.97)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: <b>196 53 498.4      20. Dezember 1996 (20.12.96)    DE</b></p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE).</b></p> <p>(74) Anwalt: <b>GASSNER, Wolfgang; Nürnberger Strasse 69/71, D-91052 Erlangen (DE).</b></p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: <b>VECTORIAL CLONING SYSTEM OF DNA</b></p> <p>(54) Bezeichnung: <b>VEKTOR-SYSTEM ZUR KLONIERUNG VON DNA</b></p>	
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"><div style="text-align: left; width: 45%;"><p><small>521</small></p><p>SCAC GGA TCA ATC GAA GGA CCG ATC AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGA CCG CAT   GCG AGC TCG GTA CC XGT GCT AGT TAG CTC CCG GCG   TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCT GCG G   TA CAC TCG AGC CAT GG His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa</p></div><div style="text-align: left; width: 45%;"><p><small>522</small></p><p>SCAC GGA TCA ATC GAA GGA CCG ATC AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGA CCG CAT   GCG AGC TCG GTA CC XGT GCT AGT TAG CTC CCG GCG   TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCT GCG G   TA CAC TCG AGC CAT GG His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa</p></div></div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"><div style="text-align: left; width: 45%;"><p><small>523</small></p><p>SCAC GGA TCA ATC GAA GGA CCG ATC AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGA CCG CAT   GCG AGC TCG GTA CC XGT GCT AGT TAG CTC CCG GCG   TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCT GCG G   TA CAC TCG AGC CAT GG His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa</p></div><div style="text-align: left; width: 45%;"><p><small>524</small></p><p>SCAC GGA TCA ATC GAA GGA CCG ATC AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGA CCG CAT   GCG AGC TCG GTA CC XGT GCT AGT TAG CTC CCG GCG   TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCT GCG G   TA CAC TCG AGC CAT GG His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa</p></div></div>	
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a vectorial cloning system consisting of a sequence of nucleotides, containing a fusion sequence and one or several restriction endonucleases, recognition sites for restriction endonucleases cutting outside their recognition sites, in addition to containing one or several other restriction endonuclease recognition sites which can be used to clone a foreign protein as well as the sequence for the desired foreign protein, wherein the foreign protein sequence is directly located on the fusion sequence after a subsequent restriction with the restriction endonucleases, followed by religation.</p>	

# (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Vektor-System zur Klonierung bestehend aus einer Sequenz von Nukleotiden, welches eine Fusionssequenz und eine oder mehrere Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, die außerhalb ihrer Erkennungsstellen schneiden, zusätzlich zu einer oder mehreren weiteren für eine Klonierung eines Fremdproteins verwendbaren Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen sowie die Sequenz für das gewünschte Fremdprotein enthält, wobei durch anschließende Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen und nachfolgende Religierung die Fremdprotein-Sequenz unmittelbar an die Fusionssequenz zu liegen kommt.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## VEKTOR-SYSTEM ZUR KLONIERUNG VON DNA

Die Erfindung betrifft ein Vektor-System zur Klonierung.

5 Gängige Vektoren, die zur Klonierung in prokaryontischen Systemen verwendet werden, enthalten in aller Regel folgende Merkmale: ein Selektionsgen, z.B. das für die Ampicillinresistenz codierende Gen, ein Markergen, das z.B. aufgrund Farbreaktion wie beim lacZ-Gen eine Unterscheidung von Vektoren mit und ohne Insert zuläßt, und vor allem ein *origin of replication*. Zum Stand der Technik ist auch auf folgende Druckschriften hinzuweisen:

- a) EP 0 532 043 A2,
- 15 b) EP 0 466 332 A2,
- c) EP 0 293 249 A1,
- d) GB 22 12 160 A und
- e) US 51 96 524.

20 Das Vektorsystem gemäß lit. c besteht aus einer Sequenz von Nukleotiden, die für die Expression eines Fusionsproteins codiert. Die Fremdprotein-Sequenz ist hier allerdings unmittelbar mit der Sequenz für ein Enzym verknüpft und nicht während des Klonierungsvorgangs durch weitere Strukturen getrennt.

In Systemen, die nicht auf Plasmiden, sondern auf Phagen basieren, kommen weitere genetische Elemente hinzu, die für die Funktionen des Lebenszyklus des Phagen wichtig sind.

30 Wird in solchen Systemen eine fremde Sequenz in ein Markergen eingesetzt, so werden dafür gewöhnlich Schnittstellen verwendet, die im Vektor nur wenige Male bevorzugterweise nur einmal vorkommen. Eine Reihe solcher Schnittstellen ist

- gewöhnlich in einem sogenannten *multiple cloning site* angeordnet. Außer diesem *multiple cloning site* kommen in einigen Vektoren, die der Expression fremder Proteine dienen, noch weitere Elemente hinzu. In einigen Genen wird dazu eine Sequenz verwendet, die in einem Fusionsprotein mit dem zu klonierenden Insert resultiert, welches dann eine Affinität zu z.B. Maltoseresten oder Nickelchelaten hat. An diese Reste schließt sich in einigen Fällen, eine Erkennungssequenz für eine Proteinase, z.B. den Faktor Xa an. Diese Proteinase-Schnittstellen ermöglichen nach der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie ein Spalten des Fusionsproteins in den Affinitätsanteil und das eigentlich zu exprimierende Fremdprotein. Da jedoch im Anschluß an diese Proteinase-Schnittstelle in aller Regel eine *multiple cloning site*-Sequenz folgt, in die zu exprimierende Sequenz einkloniert ist, verbleiben nach dem Proteinaseprozessieren des Fusionsproteins am zu exprimierenden Fremdprotein noch weitere, oft unerwünschte Aminosäuren.
- Die meisten zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenzen liegen in einer Nukleinsäure-Umgebung vor, die eine direkte Klonierung im direkten Anschluß an eine Endoproteinase-Erkennungssequenz nicht effizient mit gängigen Klonierungsstrategien zulassen. Durch die Verwendung eines *multiple cloning site* im Anschluß (d.h. 3' von der Endoproteinase-Erkennungssequenz) an die Endoproteinase-Erkennungssequenz wird eine Klonierung von zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenzen sehr erleichtert. Nachteilig ist dabei, daß man auf Proteinebene nach einem Verdau mit dem die entsprechende Proteinsequenz erkennenden Enzym nicht das zu exprimierenden Fremdprotein gewinnt, sondern ein Fusionsprotein, das die zu exprimierende Fremdprotein-Sequenz umfaßt, mit weiteren Aminosäuren, die von den Resten der *multiple cloning site* co-

diert sind.

Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen Vektorsystems zur Klonierung von Fremdproteinen, welches die Nachteile des Standes der Technik vermeidet. Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 10 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 - 9 und 11.

- 10 Die Verwendung des hier vorgestellten Klonierungsvektorsystems erlaubt nun, in einem nachfolgenden Verdau- und Religationsschritt, die zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenz direkt an eine Endoproteinase-Erkennungssequenz heranzuziehen. Dadurch ist gewährt, daß die zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenz aus einem exprimierten Fusionsprotein nach Verdau mit dem die entsprechende Proteinsequenz er-  
15 kennenden Enzym ohne weitere Anteile freigesetzt wird.

- Ein besonderer Vorteil ist auch darin zu sehen, daß im Zuge des hier vorgestellten Verfahrens eine Wahl des Leserahmens frei möglich ist. Dadurch ist nicht nur ein exaktes Positionieren des zu exprimierenden Fremdgenanteils möglich, sondern auch eine Definition des Starts des Fusionsgenanteils. Um der durch den Klonierungsvorgang bedingten unerwünschten Expression zusätzlicher Peptidanteile am zu exprimierenden Fremdgen in einfacher und dennoch hochselektiver Weise vor-  
25 zubeugen, wurde folgende Strategie gewählt:

- Es wurde die Erkennungssequenz für das Enzym BcgI verwendet, um es innerhalb der *multiple cloning site* zu klonieren, in die später mit beliebigen Enzymen die Fremdsequenz eingesetzt werden kann. BcgI ist eins der Enzyme, bislang das  
30 einzig kommerziell erhältliche, die in einem definierten Ab-

stand (10/12 Nukleotide) von ihrer Erkennungssequenz sowohl vor als auch hinter dieser Sequenz schneiden.

Damit wird durch diesen Schnitt des Enzyms also ein Sequenz-  
5 abschnitt  $2 \times 6 + 10 + 12 = 34$  bp entfernt. Eine anschließende Religation erzeugt also Sequenzen, aus denen 34 Basenpaare entfernt sind. Im Fall einer gezielten Klonierung liegen also z.B. das letzte Nukleotid der Endoproteinase-Erkennungssequenz und das erste Nukleotid des ersten Codons  
10 des zu klonierenden Proteins unmittelbar zusammen. Beispielssequenzen sind in Beispiel 1 bei der Auflistung einiger Anwendungen aufgeführt.

Besondere Vorteile des BcgI-Systems umfassen dessen Neigung,  
15 je nach Pufferkonzentration in 10-50% der Fälle zu kleinen Deletionen (in der Regel 3 Nukleotide) an der Schnittstelle zu führen. Das bewirkt, daß in diesen Fällen dann die erste Aminosäure des zu exprimierenden Fremdproteins, in der Regel Methionin, nach dem Verdau mit dem die entsprechende Proteinsequenz erkennenden Enzym nicht mehr Bestandteil des zu  
20 exprimierenden Fremdproteins ist, das dabei freigesetzt wird.

Man erhält ein ähnliches Ergebnis, wenn man zwei Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen verwendet; die eine im  
25 oder in unmittelbarer Nähe vom Bereich einer Endoproteinase-Erkennungssequenz und eine weitere, damit ligationskompatible Erkennungsstelle, unmittelbar vor der zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenz, so daß ein Verdau mit der entsprechenden  
30 den Restriktionsendonuklease und anschließender Religation den Beginn der zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenz unmittelbar an die Endoproteinase-Erkennungssequenz heranzuführt.

Im folgenden wird die Erfindung anhand einiger Sequenzen und Beispiele erläutert. Es zeigen

- Fig. 1 eine erste Sequenz,
- 5 Fig. 2 eine zweite Sequenz der multiplen Klonierungsstelle,
- Fig. 3 eine dritte Sequenz am Beispiel BamHI,
- 10 Fig. 4 eine vierte Sequenz am Beispiel ClaI,
- Fig. 5 eine der vorhergehenden Sequenzen nach Restriktion und Religierung,
- 15 Fig. 6 eine fünfte Sequenz, nämlich eine Fusionssequenz, und
- Fig. 7 eine sechste Sequenz, die eine BcgI-Erkennungsstelle enthält.
- 20

Die in Fig. 1 gezeigte erste Sequenz läßt eine Klonierung in allen drei Leserahmen zu.

- 25 1. Liegt z.B. unmittelbar vor dem ATG eines zu exprimierenden Fremdgens eine Not I oder AscI Erkennungsstelle, so kann dieses Enzym genutzt werden, das Fragment zu einem stumpfen Ende aufgefüllt werden und an das mit HincII geschnittene Ausgangs-Konstrukt kloniert werden. Das ist in Fig. 2 ge-
- 30 zeigt.

2. Liegt z.B. unmittelbar vor dem ATG eines zu exprimierenden Fremdgens eine beliebige Restriktions-Erkennungsstelle,

die ein 4 Nukleotide 3'überhängendes Ende generiert, so kann dieses Enzym genutzt werden, das Fragment zu einem stumpfen Ende aufgefüllt werden und an das mit AccI geschnittene und ebenfalls aufgefüllte Ausgangs-Konstrukt kloniert werden.

5 Das ist in Fig. 3 am Beispiel BamHI gezeigt.

3. Liegt z.B. unmittelbar vor dem ATG eines zu exprimierenden Fremgens eine beliebige Restriktions-Erkennungsstelle, die ein 2 Nukleotide 3'über überhängendes Ende generiert, so  
10 kann dieses Enzym genutzt werden, das Fragment zu einem stumpfen Ende aufgefüllt werden und an das mit SalI geschnittene und ebenfalls aufgefüllte Ausgangs-Konstrukt kloniert werden. Das ist am Beispiel ClaI in Fig. 4 gezeigt.

15 Nach einer anschließenden BcgI Restriktion und Religierung liegt in jedem der Fälle eine Sequenz vom in Fig. 5 gezeigten Typ vor.

Dabei folgt das erste Nukleotid der zu exprimierenden Sequenz unmittelbar auf die Xa Protease Erkennungsstelle.  
20

#### Beispiel 1: Design des Vektorsystems.

Es wurde ein induzierbares prokaryontisches Promotorsystem  
25 verwendet, das mit IPTG induzierbare lacZ-System, wie es in dem Vektor pQE30 der Fa. Qiagen vorliegt. In diesem Vektor folgt danach als erste proteincodierende Sequenz eine Abfolge von 6 Histidin-Resten. In unserem Konstrukt schließt sich unmittelbar daran eine Schnittstelle für die Endoproteinase  
30 Xa an. Die entsprechende fünfte Sequenz ist in Fig. 6 gezeigt.

In unserem Konstrukt folgt im Anschluß daran eine *multiple*



*cloning site*, die eine BcgI-Erkennungsstelle enthält. Das ist Fig. 7 gezeigt.

Da eine BcgI-Stelle in dem von uns verwendeten Ausgangsvektor ebenfalls in der für Ampicillinresistenz codierenden Region vorkommt, wurde diese dort vorkommende Schnittstelle durch in vitro Mutagenese zerstört, die Ampicillinresistenz-Eigenschaft blieb dabei erhalten.

- 10 Beispiel 2: Klonierung eines Fremdproteins, hier das Strukturprotein VP1 des Polyomavirus, in dieses Klonierungsvektor-System.

VP1 enthält eine für eine Klonierung geeignete Schnittstelle (BamHI) im Abstand von 6 Nukleotiden vor seinem Methioninstartkodon. Eine weitere für die Klonierung notwendige Schnittstelle, SphI, folgt im Abstand von 59 Nukleotiden auf seine codierende Sequenz. Das Klonierungsvektor-System ebenso wie das Konstrukt, das die VP1-codierende Region umfaßt, wurden mit den geeigneten Restriktionsendonukleasen, AccI/blunt und SphI, geschnitten. Die codierende Sequenz wurde in das so vorbereitete Klonierungsvektorsystem ligiert, transformiert und durch Wachstum in *E. coli*-Zellen (XL1 blue(lacIq), verhindert Expression in Abwesenheit von IPTG) amplifiziert. Größere Mengen des so hergestellten Plasmidkonstrukts wurden isoliert und aufgereinigt für die weitere Bearbeitung.

Das aufgereinigte Konstrukt wurde nun mit dem Enzym BcgI verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt und anschließend religiert und erneut in Bakterien, die für eine Expression besonders geeignet sind (RB791, ein Derivat von W3110 mit lacIqL8) transformiert und dort amplifiziert.

In drei unabhängigen Klonen wurde gefunden, daß die codierende Sequenz des VP1-Proteins, beginnend mit Methionin, unmittelbar nach der letzten Aminosäure der Faktor Xa-Schnittstelle vorkam (IleGluGlyArg).

5

In einem Klon wurde festgestellt, daß auf die Sequenz des Faktor Xa die codierende Sequenz des VP1-Proteins folgte, daß jedoch die drei Nukleotide, die für Methionin codieren, deletiert waren. Bei Wiederholung der Versuche mit  
10 weiteren Proteinen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

### Beispiel 3: Expression eines Fremdproteins

Konstrukte, die für ein Fusionsprotein mit VP1 codierten,  
15 wurden in Bakterienzellen (RB79 1) transformiert und in einer Übernachtskultur angezogen. Aus dieser Übernachtskultur wurden Bakterienkulturen bis zu einer Dichte von ca 0,8A<sub>600</sub> herangezogen. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG eine Expression des Fusionsproteins umfassend die Histidinreste,  
20 die Faktor Xa-Erkennungsstelle und VP1, induziert. Nach 6 Stunden Induktion wurde Gesamtprotein geerntet und ein Aliquot zur Überprüfung der Induktionseffizienz auf ein Gel aufgetragen. Der Hauptteil dieser Proteinmischung wurde an eine Nickelchelate-Säule entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen) gebunden und dort mit verschiedenen Puffern  
25 gewaschen. Mittels einer Lösung, die 50 mM ETGA enthält, läßt sich das Fusionsprotein aus der Säule eluieren. In unserem Fall wurde jedoch durch anschließenden Verdau unter Zugabe der Endoproteinase Faktor Xa das reine Expressionsprotein VP1 freigesetzt.  
30

## Patentansprüche

1. Ein Vektor-System zur Klonierung bestehend aus einer Sequenz von Nukleotiden, welches  
5 eine Fusionssequenz (1)  
und eine oder mehrere Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen (2), die außerhalb ihrer Erkennungsstellen schneiden,  
zusätzlich zu einer oder mehreren weiteren für eine  
10 Klonierung eines Fremdproteins verwendbaren Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen (3) sowie die Sequenz für das gewünschte Fremdprotein enthält,  
wobei durch anschließende Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen (2) und nachfolgende Religierung die  
15 Fremdprotein-Sequenz unmittelbar an die Fusionssequenz (1) zu liegen kommt.
2. Vektor-System gemäß Anspruch 1, wobei die Fusionssequenz (1) eine Endoproteinase-Erkennungssequenz codiert.  
20
3. Vektor-System gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei bei der Verwendung von mehreren Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen (2) diese vom gleichen oder isoschizomeren Enzym erkannt werden.  
25
4. Vektor-System gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Restriktionsendonukleasen-Erkennungsstellen (2) zwei unterschiedliche, aber ligationskompatible Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen sind.  
30
5. Vektor-System gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei nur eine Restriktionsendonuklease-Erkennungsstelle (2) mit zwei Schnittstellen vorliegt.

6. Vektor-System nach Anspruch 5, wobei die Restriktionsendonuklease-Erkennungsstelle (2) eine Erkennungsstelle für BcgI ist.

5

7. Verwendung eines Vektor-Systems gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Klonierung von Fremdproteinen.

8. Kit zur Klonierung von Fremdproteinen, enthaltend ein  
10 Vektor-System gemäß einem der Ansprüche 1-6.

9. Verfahren zur Klonierung von Fremdproteinen unter Verwendung eines Klonierungsvektor-Systems gemäß einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-  
15 Sequenz für das gewünschte Protein in eine multiple Klonierungsstelle (3) inseriert wird, die der Fusionssequenz (1) benachbart ist, und durch anschließende Restriktion mit der Restriktionsendonuklease (2) und nachfolgende Religierung die Fremdproteinsequenz unmittelbar an die Fusionssequenz  
20 (1) zu liegen kommt und anschließende Expression des Fusionsproteins.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Expression des Fusionsproteins das gewünschte Protein durch Spaltung des Fusionsproteins an einer am Ende der  
25 Fusionssequenz (1) lokalisierten Endoprotease-Schnittstelle erhalten wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß  
30 durch Verwendung von BcgI als Restriktionsendonuklease (2) am gewünschten Protein die N-terminale erste Aminosäure deletiert ist.

SfiI RsrII  
 5' CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT | C AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGA CCG CAT | GCG AGC TCG GTA CC  
 3' GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG | TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCT GGC G | TA CGC TCG AGC CAT GG  
 His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa  
 -----  
 BcgI HincII SphI SacI KpnI

Fig. 1

SfiI RsrII  
 5' CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT | C AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGG CCG CAT | GNN NNN  
 3' GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG | TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCC GGC G | TA CNN NNN  
 His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa  
 BcgI (HincII) (NotI)

Fig. 2

SfiI RsrII  
 5' CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT | C AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGG ATC CAT | GNN NNN  
 3' GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG | TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCC TAG G | TA CNN NNN  
 His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa  
 BcgI (HincII) (BamHI)

Fig. 3

SfiI RsrII  
 5' CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT | C ACC CTC CTC CGA CCT CAC TGC AGT CGA CGA TAT | GNN NNN  
 3' GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG | TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCT TAG A | TA CNN NNN  
 His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa  
 BcgI (HincII) (ClaI)

Fig. 4

**Fig. 5**

Sfil                      RsrII

5' CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC ATG NNN  
3' GTA GTG GTA GTG GTA GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG TAC NNN

His His His His His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Met Xa|

5' CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC  
3' GTA GTG GTA GTG GTA GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG  
His His His His His His His Gly Ser Ile Glu Gly Arg --Xa

**Fig. 6**

Sfil Rsrll

... ..

5' CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT | C AGC CTG GTC CGA GGT GAG TGC AGT CGA CCG CAT | GCG AGC TCG GTA CC

3' GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG | TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCT GGC G / TA CGC TCG AGC CAT GG

His Gly Ser Ile Glu Gly Arg

Bgl -

Xa

HincII

SphI SacI KpnI

**Fig. 7**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.  
PCT/DE 97/02963

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/10 C12N15/62 C12N15/66 C12N15/70 //C12N9/22		
According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 532 043 A (HITACHI LTD) 17 March 1993 cited in the application see the whole document ---	1-11
A	P. MARKMEYER ET AL.: "The pAX plasmids: new gene-fusion vectors for sequencing, mutagenesis and expression of proteins in Escherichia coli" GENE, vol. 93, no. 1, 1 September 1990, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, pages 129-134, XP002065733 see the whole document ---	1-11
A	EP 0 466 332 A (NEW ENGLAND BIOLABS INC) 15 January 1992 cited in the application see the whole document ---	1-11
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <span style="margin-left: 100px;"><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25 May 1998</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">08/06/1998</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Hornig, H</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No  
PCT/DE 97/02963

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 293 249 A (AMRAD CORP LTD) 30 November 1988 cited in the application see the whole document ---	1-11
A	EP 0 161 937 A (CELLTECH LTD) 21 November 1985 see the whole document -----	1-11



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/02963

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0532043	A	17-03-1993	JP 5068557 A	23-03-1993
			DE 69220306 D	17-07-1997
			DE 69220306 T	11-12-1997
EP 0466332	A	15-01-1992	US 5200336 A	06-04-1993
			DE 69105377 D	12-01-1995
			DE 69105377 T	06-07-1995
			DE 466332 T	03-02-1994
			JP 6339374 A	13-12-1994
EP 0293249	A	30-11-1988	AU 607511 B	07-03-1991
			AU 1793288 A	21-12-1988
			WO 8809372 A	01-12-1988
			CA 1338903 A	11-02-1997
			DE 3873989 A	01-10-1992
			DK 38189 A	27-01-1989
			ES 2045115 T	16-01-1994
			JP 6081596 B	19-10-1994
			JP 1503441 T	22-11-1989
			NO 178894 B	18-03-1996
			US 5654176 A	05-08-1997
EP 0161937	A	21-11-1985	AU 585857 B	29-06-1989
			AU 4247485 A	21-11-1985
			DE 3586750 A	19-11-1992
			DK 217985 A	17-11-1985
			GB 2160206 A,B	18-12-1985
			JP 1973695 C	27-09-1995
			JP 7004253 B	25-01-1995
			JP 61135591 A	23-06-1986

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02963

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 C12N15/10 C12N15/62 C12N15/66 C12N15/70 //C12N9/22		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 532 043 A (HITACHI LTD) 17.März 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	P. MARKMEYER ET AL.: "The pAX plasmids: new gene-fusion vectors for sequencing, mutagenesis and expression of proteins in Escherichia coli" GENE, Bd. 93, Nr. 1, 1.September 1990, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Seiten 129-134, XP002065733 siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	EP 0 466 332 A (NEW ENGLAND BIOLABS INC) 15.Januar 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="width: 50%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25.Mai 1998		08/06/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Hornig, H

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/DE 97/02963

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 293 249 A (AMRAD CORP LTD) 30.November 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	EP 0 161 937 A (CELLTECH LTD) 21.November 1985 siehe das ganze Dokument -----	1-11

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat: 95 Aktenzeichen

PCT/DE 97/02963

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0532043 A	17-03-1993	JP 5068557 A	23-03-1993
		DE 69220306 D	17-07-1997
		DE 69220306 T	11-12-1997
EP 0466332 A	15-01-1992	US 5200336 A	06-04-1993
		DE 69105377 D	12-01-1995
		DE 69105377 T	06-07-1995
		DE 466332 T	03-02-1994
		JP 6339374 A	13-12-1994
EP 0293249 A	30-11-1988	AU 607511 B	07-03-1991
		AU 1793288 A	21-12-1988
		WO 8809372 A	01-12-1988
		CA 1338903 A	11-02-1997
		DE 3873989 A	01-10-1992
		DK 38189 A	27-01-1989
		ES 2045115 T	16-01-1994
		JP 6081596 B	19-10-1994
		JP 1503441 T	22-11-1989
		NO 178894 B	18-03-1996
		US 5654176 A	05-08-1997
EP 0161937 A	21-11-1985	AU 585857 B	29-06-1989
		AU 4247485 A	21-11-1985
		DE 3586750 A	19-11-1992
		DK 217985 A	17-11-1985
		GB 2160206 A, B	18-12-1985
		JP 1973695 C	27-09-1995
		JP 7004253 B	25-01-1995
		JP 61135591 A	23-06-1986